

乙酰胆碱酯酶敏感性的变化与家蝇 抗药性的关系

李月明 孙耘芹 龚坤元

(中国科学院动物研究所)

摘要 结合抗性机理,对四个家蝇 (*Musca domestica vicina*) 品系头部的乙酰胆碱酯酶 (AchE) 对底物和抑制剂反应的动力学进行了研究。结果表明, AchE 敏感性的降低是引起两个有机磷药剂 (OP) 抗性品系 DDVP-R 和 Trichl-R 对 OP 交互抗性的一个主要因子。Trichl-R 对二氯苯醚菊酯无抗性,而二氯苯醚菊酯抗性品系 2Cl-R 对所测定的 OP 有负交互抗性,并且它的 AchE 对 OP 的敏感性较正常品系 (NP) AchE 的敏感性要高。AchE 敏感性的变化,反应在酶结构上,主要是酶对抑制剂的亲和性 (K_d) 的变化,而磷酸化速率 (K_2) 影响不大。同时对 AchE 的底物和抑制剂结合位点及结构变化进行了分析和探讨。

关键词 家蝇 乙酰胆碱酯酶 敏感性 抗性 负交互抗性

乙酰胆碱酯酶 (AchE) 是有机磷杀虫剂的靶子酶,它的敏感性的改变,可以引起昆虫对药剂的抗性,是导致对有机磷杀虫剂产生抗性的因子之一。目前发现,由于 AchE 敏感性的降低而引起抗性的节肢动物种类已有十几种,如家蝇 (Tripathi 和 O'Brien, 1973), 蚊虫 (Ayad 和 Georgiou, 1975), 黑尾叶蝉 (Hama 和 Iwata, 1978); 鳞类 (Smissaert, 1964), 牛虻 (Lee 和 Batham, 1966) 和海灰翅夜蛾 (Dittrich 等, 1979) 和棉蚜 (孙耘芹等, 1987)。家蝇 AchE 与抗性的关系方面已做不少工作 (Tripathi 和 O'Brien, 1973; Devonshire, 1975; Voss, 1980; Motoyama 等, 1980; Ugaki 等, 1981; Yeoh 等, 1981)。家蝇在我国对于有机磷药剂的抗性已十分严重,但这一方面的工作还开展得不够,不敏感的 AchE 是否作为其中的一个抗性因子,还未见报道。我们对不同品系的 AchE 的底物和抑制剂反应,结合它们的抗性情况进行了探讨。

材料与 方法

一、材料

1. 家蝇 (*Musca domestica vicina*) 品系:

(1) 正常品系 (NP), 室内饲养,未接触过杀虫药剂。

(2) 抗性品系: DDVP-R, Trichl-R 和 2Cl-R 分别为抗 DDVP, 敌百虫和二氯苯醚菊酯品系,都由“南口”品系选育而来,分别开始于 1978 和 1979 年,每代成虫用其药剂处理。

本文于 1985 年 3 月收到。

在实验中,冯国替、冷欣夫和袁家珪先生给予指导和帮助,特此致谢。

四个家蝇品系对三种有机磷药剂和一种拟除虫菊酯的 LD_{50} 值和抗性比值, 见表 1。 LD_{50} 值说明两个有机磷药剂抗性品系 DDVP-R 和 Trichl-R 对所测定的有机磷存在着一定程度的交互抗性。Trichl-R 品系较 DDVP-R 品系对三种有机磷药剂的抗性要高。

表 1 四个家蝇品系对几种杀虫剂的 LD_{50} 值及抗性比值

品系	LD_{50} 值和抗性比值 (R_t)							
	DDVP		敌百虫		E605		二氯苯醚菊酯	
	LD_{50}	R_t^{**}	LD_{50}	R_t	LD_{50}	R_t	LD_{50}	R_t
NP	0.1044		12.08		0.6233		0.0151	
DDVP-R	0.7477	7.2	184	15.2	4.488	7.2	—	—
Trichl-R	1.0930	10.5	215	17.8	11.81	20	0.0168	1.1
2Cl-R	0.0802	0.77	2.082	0.17	0.5134	0.83	4.378	290

* LD_{50} : $\mu\text{g}/\text{蝇}$ ** 抗性品系的 LD_{50}/NP 品系的 LD_{50}

十分有意义的是 Trichl-R 品系对二氯苯醚菊酯无抗性, 而 2Cl-R 对二氯苯醚菊酯的抗性比较高, 对所测定的有机磷药剂更加敏感, 存在着负交互抗性 (0.17—0.83 倍)。这种现象在家蝇中虽然为第一次发现, 但在其他种类的节肢动物曾有报道: 海灰翅夜蛾有机磷抗性品系对氯氰菊酯、溴氰菊酯和杀灭菊酯的耐性很低 (2.9—4.0 倍) (Riskallah, 1980), 杀灭菊酯和溴氰菊酯抗性品系对百治磷和甲胺磷存在着负交互抗性 (0.21—0.90 倍) (Riskallah 等, 1983); 而棉叶螨谷硫磷抗性品系对杀灭菊酯有负交互抗性 (Chapman 和 Penman, 1979)。有机磷药剂和拟除虫菊酯类在某些种类的节肢动物中起着相反的选择作用, 这对于合理使用农药, 克服和延缓抗性是十分重要的。

2. AchE 活性 米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} 四个家蝇品系头部 AchE 对于底物 ATCh、PrTch 和 BuTch 的活性及动力学参数 K_m 和 V_{max} , 见表 2 和表 3。每一品系 AchE 对三个底物的活性和 V_{max} 的顺序为对 ATCh 最高, PrTch 次之, BuTch 最低。即随酰基碳原子数目的增加, 酶的活性和 V_{max} 下降, 而对于三个底物的 K_m , 则从大到小为 BuTch、ATCh 和 PrTch, 即对于 PrTch 亲和性最高, BuTch 最低, 表明家蝇头部的 AchE 对于底物 ATCh 和 PrTch 有较好的反应性, BuTch 则比较差。不同品系的 AchE 对于同一底物的活性, K_m 和 V_{max} 都相差很小, 说明各品系 AchE 之间对于底物有相同的反应, 结构上没有发生什么变化。

表 2 四个家蝇品系头部 AchE 对底物 ATCh、PrTch 和 BuTch 的活性*

品系	底物		
	ATCh	PrTch	BuTch
NP	0.1312	0.0803	0.0470
DDVP-R	0.1248	0.0722	0.0466
Trichl-R	0.1233	0.0708	0.0442
2Cl-R	0.1318	0.0846	0.0416

* $\mu\text{mole}/\text{小时} \times \text{mg}$ 蛋白

表3 四个家蝇品系头部 AchE 对底物 ATch、PrTch 和 BuTch 的 K_m 和 V_{max}

品系	底 物					
	ATch		PrTch		BuTch	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
NP	6.553 (0.579)	0.1431 (0.0030)	3.182 (0.181)	0.0833 (0.0009)	38.61 (0.885)	0.0741 (0.0057)
DDVP-R	5.352 (0.885)	0.1334 (0.0051)	2.229 (0.666)	0.0741 (0.0037)	19.75 (6.249)	0.0619 (0.0050)
Trichl-R	4.977 (0.589)	0.1279 (0.0032)	1.840 (0.405)	0.0718 (0.0024)	26.04 (7.156)	0.0667 (0.0054)
2Cl-R	5.491 (1.056)	0.1451 (0.0062)	3.015 (0.434)	0.0862 (0.0023)	13.72 (0.442)	0.0498 (0.0021)

 K_m : mole $\times 10^3$ V_{max} : μ mole/小时 $\times$ mg 蛋白

括号内数据为标准误。

3. 家蝇头部 AchE 与有机磷抑制剂的反应 四个家蝇品系头部 AchE 对 E600、DDVP 和敌百虫抑制剂的解离常数 K_d 、磷酸化常数 K_2 和双分子反应常数 K_1 见表 4, 可以看出各品系 AchE 之间对于抑制剂的 K_d 和 K_1 差异比较大, 而 K_2 则差异很小, 说明各品系 AchE 对抑制剂的亲和性和敏感性有很大的不同, 而磷酸化能力则基本相同。两个有机磷抗性品系 DDVP-R 和 Trichl-R 的 AchE, 对抑制剂的亲和力比较低, 与 NP 品系 AchE 相比, 对 E600 分别相差 90 和 30 倍, 对 DDVP 分别相差 13 和 12 倍, K_2 值除 DDVP-R 品系对 E600 比较大外 (是 NP 品系的 2.5 倍), 其他则介于 0.327 和 0.431 之间。而 DDVP-R 和 Trichl-R 品系 AchE 对抑制剂的敏感性则比较低, 与 NP 品系 AchE 相比, 对 E600 分别相差 13 和 12 倍, 对 DDVP 分别相差 18 和 17 倍, 表明它们的酶结构不同, 说明不敏感的 AchE 是两个有机磷抗性品系的抗性因子之一, 而这种不敏感性主要是由于酶对抑制剂的亲和性下降所引起的, 而磷酸化速率影响不大。2Cl-R 品系 AchE 也发生了改变, 但它对抑制剂的亲和能力增加, 与 NP 品系 AchE 相比, 对 E600、DDVP 和敌百虫分别增加了 8.3、17 和 3 倍, 敏感性分别增加了 5、1.4 和 5 倍。图 1 是 NP 与 2Cl-R 品系 AchE 以 1:1 混合后, 对 E600 的抑制反应, 表明存在着敏感性不同的两种形式的 AchE, 进一步证明这两个品系 AchE 对于抑制剂反应的差异, 是酶本身结构的不同, 并非其他因子所造成。2Cl-R 品系 AchE 的敏感性增加可以解释为它对有机磷药剂的负交互抗性, 但为什么二氯苯醚菊酯选择会导致这种结果, 还有待于进一步的研究, 因为有实验表明, 拟除虫菊酯对神经的兴奋与 AchE 是否被抑制完全无关 (张宗炳, 1982), 即除虫菊酯不直接作用于 AchE。

家蝇对有机磷杀虫剂的抗性, 经过较长时间的选择后, 会形成多因子抗性 (Oppenorth 等, 1977; Yeoh 等, 1981), 不敏感的 AchE 能够引起多大程度的抗性, 在不了解其他抗性因子之前, 是很难确定的。DDVP-R 品系对 DDVP 和 E605 的抗性都为 7 倍, 相应于它的 AchE 对 DDVP 和 E600 的 18 和 13 倍的不敏感性; Trichl-R 品系对 DDVP 和 E605 的 11 和 20 倍的抗性, 相应于它的 AchE 对 DDVP 和 E600 的 17 和

表5 不同家蝇品系头部 AchE 对底物和抑制剂亲和性的差异

参数	底物或抑制剂	品 系		
		DDVP-R	Trichl-R	2Cl-R
$K_m(R/S)^*$	ATch	0.82	0.76	0.84
	PrTch	0.70	0.58	0.95
	BuTch	0.51	0.67	0.36
$K_d(R/S)^{**}$	E600	30.75	8.75	0.11
	DDVP	19.98	17.87	0.58
	敌百虫	—	—	0.31

* 抗性品系的 K_m /NP 品系的 K_m ** 抗性品系的 K_d /NP 品系的 K_d

更加敏感是导致它对这类药剂的负交互抗性的原因之一。

参 考 文 献

- 孙标芹等 1987 棉蚜对有机磷杀虫剂抗性的生化机理。昆虫学报 30(1): 13—20。
- 龚坤元 1964 LD₅₀ 演算的新发展。《杀虫剂与昆虫毒理进展》1。科学出版社。P 152。
- 张宗炳 1982 除虫菊酯的生物化学及毒理机制。《昆虫毒理学的新进展》。北京大学出版社。P1—38。
- Ayad, H. and G. P. Geoghiou 1975 Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles albimanus* based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *J. Econ. Entomol.* 69: 295.
- Chapman, R. B. And D. R. Penman 1979 Negatively correlated cross resistance to a synthetic pyrethroid in organophosphorus-resistant *Tetranychus urticae*. *Nature (Lond.)* 281: 298.
- Devonshire, A. L. 1975 Studies of the acetylcholinesterase from houseflies (*Musca domestica* L.) resistant and susceptible to organophosphorus insecticides. *Biochem. J.* 149: 163.
- Dittrich et al 1979 Monocrotophos and Profenofos: Two organophosphates with a different mechanism of action in resistant races of *Spodoptera littoralis*. *J. Econ. Entomol.* 72: 380.
- Ellman, G. L. et al 1961 A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88.
- Hama, H. and I. Iwata 1978 Studies on the inheritance of carbamate resistance in the green rich leafhopper, *Neophotetrix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae): Relation between insensitivity of acetylcholinesterase and cross resistance to carbamate and organophosphate insecticides. *Appl. Ent. Zool.* 13: 190.
- Hart, G. J. and R. D. O'Brien 1973 Recording spectrophotometric method for determination of dissociation and phosphorylation constants for the inhibition of acetylcholinesterase by organophosphates in the presence of substrate. *Biochemistry* 12: 2940.
- Lee, R. M. and P. Batham 1966 The activity of organophosphate inhibition of cholinesterase from susceptible and resistant tick (Acari). *Ent. Exp. Appl.* 9: 13.
- Lowry, D. H. et al 1951 Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- Main, A. R. 1964 Affinity and phosphorylation constants for the inhibition of esterases by organophosphates. *Science* 144: 992.
- Moorthfield, H. H. 1957 Improved method of harvesting house fly heads for use in cholinesterase studies. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 18: 463.
- Motoyama, T. et al 1980 Multiple factors for organophosphorus resistance in the housefly (*Musca domestica* L.) *J. Pesti. Sci.* 5: 393.
- Oppenoorth, F. J. et al 1977 Insensitive acetylcholinesterase high glutathion S-transferase and hydrolytic activity as resistant factors in a tetrachlorvinphos resistant strain of housefly. *Pestic. Biochem. Physiol.* 7: 34.
- Riskallah, M. R. 1980 Reduced sensitivity of cholinesterase as a factor of resistance in leptophos selected strain of the Egyptian cotton leafworm. *J. Environ. Sci. Health B15*: 181.
- Riskallah, M. R. et al 1983 Development of resistance and cross-resistance in fenvalerate and deltamethrin selected strains of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) *Pestic. Sci.* 14: 508.
- Smissaert, H. R. 1964 Cholinesterase inhibition in spider mites of susceptible and resistant to organophosphate.

Science 143: 129.

Tripathi, R. K. and R. D. O'Brien 1973 Insensitivity of acetylcholinesterase as a factor in resistance of house flies to organophosphate Rabon. *Pestic. Biochem. Physiol.* 3: 495.

Ugaki, M. et al 1981 Insensitive acetylcholinesterase in organophosphorus insecticide-resistant houseflies, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) collected from various localities in Japan. *Appl. Ent. Zool.* 16: 506.

Voss, G. 1980 Cholinesterase autoanalysis: A rapid method for biochemical studies on susceptible and resistant insects. *J. Econ. Entomol.* 73: 189.

Wilkinson, G. N. 1961 Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem. J.* 80: 324.

Yeoh, C. L. et al 1981 Studies on the mechanisms of organophosphate resistance in oriental houseflies, *Musca domestica vicina* Macquart (Diptera: Muscidae). *Appl. Ent. Zool.* 16: 247.

RELATIONSHIP BETWEEN SENSITIVITY OF HOUSEFLY ACETYLCHOLINESTERASE AND RESISTANCE TO INSECTICIDES

LI YUE-MING SUN YUN-QIN GONG KUN-YUAN

(*Institute of Zoology, Academia Sinica*)

The present paper dealt with the essential properties of acetylcholinesterase (AChE) from four strains of the house fly (*Musca domestica vicina*), such as K_m and V_{max} to substrates ATch, PrTch and BuTch, dissociation constant (K_a), phosphorylation constant (K_2) and bimolecular reaction constants (K_i) to inhibitors paraoxon, DDVP and trichlorfon. The results indicated that insensitivity of AChE was one of the main factors for resistance in organophosphate (OP)-resistant strains DDVP-R and Trichl-R. Trichl-R strain did not display cross-resistance to permethrin. However, a negative cross resistance was observed in the permethrin-resistant strain 2Cl-R to three OPs tested. It might be one of the reason to account that the inhibition of 2Cl-R AChE by the OPs was more sensitive than that of the normal strain NP. The change of AChE sensitivity, as measured by K_i , was mainly attributable to difference in their affinity constant (K_a) with the inhibitors whereas K_2 did not differ significantly. The binding sites of AChE for substrates and inhibitors and the enzyme structure were discussed. The major changes in the enzyme structure accompanying resistance might involve changes in the binding site for the inhibitor.

Key words Housefly—AChE—AChE sensitivity—OP resistance—negative cross resistance.